

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

PCT Application
PCT/JP2003/005464



Applicant's or agent's file reference PH-1796-PCT	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP03/05464	International filing date (day/month/year) 28 April 2003 (28.04.03)	Priority date (day/month/year) 26 April 2002 (26.04.02)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/09, 1/19, 9/04, 9/10, 9/50 // C12R 1:645		
Applicant KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 11 sheets, including this cover sheet.
- ☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).
- These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☒ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability, citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

CORRECTED
VERSION

Date of submission of the demand 28 April 2003 (28.04.03)	Date of completion of this report 04 November 2003 (04.11.2003)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP03/05464

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the claims:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item. These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP03/05464

IV. Lack of unity of invention

1. In response to the invitation to restrict or pay additional fees the applicant has:

- ☐ restricted the claims.
- ☐ paid additional fees.
- ☐ paid additional fees under protest.
- ☐ neither restricted nor paid additional fees.

2. ☒ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose, according to Rule 68.1, not to invite the applicant to restrict or pay additional fees.

3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rules 13.1, 13.2 and 13.3 is

- ☐ complied with.
- ☒ not complied with for the following reasons:

SEE SUPPLEMENTAL SHEET

4. Consequently, the following parts of the international application were the subject of international preliminary examination in establishing this report:

- ☒ all parts.
- ☐ the parts relating to claims Nos. _____

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: IV.3

The inventions of the present international application can be classified into the following groups:

- (1) claims 1-25 and 94-122: inventions pertaining to methods for producing a methylotroph yeast that is capable of producing a mammalian-type sugar chain;
- (2) claims 26-30: inventions pertaining to an orotidine-5'-phosphate decarboxylase (URA3) gene;
- (3) claims 31-35: inventions pertaining to a phosphoribosyl-amino-imidazole succinocarboxamide synthase (ADE1) gene;
- (4) claims 36-40: inventions pertaining to an imidazole-glycerol-phosphate dehydratase (HIS3) gene;
- (5) claims 41-45: inventions pertaining to a 3-isopropylmalate dehydrogenase (LEU2) gene;
- (6) claims 46-49: inventions pertaining to an α -1,6-mannosyltransferase (OCH1) gene;
- (7) claims 50-53: inventions pertaining to a PEP4 gene;
- (8) claims 54-57: inventions pertaining to a proteinase B (PRB1) gene;
- (9) claims 58-69: inventions pertaining to a YPS1 gene;
- (10) claims 70-73: inventions pertaining to a KTR1 gene;
- (11) claims 74-77: inventions pertaining to an MNN9 gene;
- (12) claims 78-85: inventions pertaining to an alcohol oxidase (AOX) gene; and
- (13) claims 86-93: inventions pertaining to a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene.

However, the methods for producing a methylotroph yeast that is capable of producing a mammalian-type sugar chain in group (1), and the inventions related to the orotidine-5'-phosphate decarboxylase (URA3) gene in group

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: IV.3

(2), the phosphoribosyl-amino-imidazole succinocarboxamide synthase (ADE1) gene in group (3), the imidazole-glycerol-phosphate dehydratase (HIS3) gene in group (4), the 3-isopropylmalate dehydrogenase (LEU2) gene in group (5), the α -1,6-mannosyltransferase (OCH1) gene in group (6), the PEP4 gene in group (7), the proteinase B (PRB1) gene in group (8), the YPS1 gene in group (9), the KTR1 gene in group (10), the MNN9 gene in group (11), the alcohol oxidase (AOX) gene in group (12), and the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene in group (13) were all well-known prior to the priority date of the present application (refer to "C. Documents Considered to be Relevant" in the international search report); therefore, these features cannot be considered to be special technical features in the light of the prior art.

Consequently, these 13 groups of inventions cannot be considered to be a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP 03/05464

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**1. Statement**

Novelty (N)	Claims	4-5, 8-9, 15, 17-22, 26-122	YES
	Claims	1-3, 6-7, 10-14, 16, 23-25	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-122	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-122	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Document 1: WO 02/00856 A2 (Flanders Interuniversity Institute for Biotechnology), 03 January 2002, claims, examples, & US 2002/188109 A & EP 1294910 A2

Document 2: WO 02/00879 A2 (Glycofi Inc.), 03 January 2002, claims, table 3, examples, & US 2002/137134 A & EP 1297172 A2

Document 3: Yasuyoshi SAKAI et al., "The Orotidine-5'-Phosphate Decarboxylase Gene (URA3) of a Methylophilic Yeast, *Candida boidinii*: Nucleotide Sequence and its Expression in *Escherichia coli*," Journal of Fermentation and Bioengineering, 1992, Vol. 73(4), pages 255-260, entire document, especially fig. 2

Document 4: Vina W. YANG et al., "High-Efficiency Transformation of *Pichia stipitis* Based on its URA3 Gene and a Homologous Autonomous Replication Sequence, ARS2," Applied and Environmental Microbiology, 1994, Vol. 60(12), pages 4245-4254, entire document, especially fig. 3

Document 5: Yoshiaki NISHIYA et al., "Primary Structure of ADE1 Gene from *Candida utilis*," Bioscience Biotechnology and Biochemistry,

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP 03/05464

- 1994, Vol. 58(1), pages 208-210, entire document, especially fig. 3
- Document 6: Inmaculada C. COSANO et al., "Cloning and Sequence Analysis of the *Pichia pastoris* TRP1, IPP1 and HIS3 Genes," Yeast, 1998, Vol. 14, pages 861-867, entire document, especially fig. 4
- Document 7: WO 98/14600 A1 (Centro de Ingenieria y Biotecnologia), 09 April 1998, claims, SEQ ID NO: 5-6, & JP 2001-501475 A & EP 956356 A1
- Document 8: Yasuyoshi SAKAI et al., "Directed Mutagenesis in an Asporogenous Methylophilic Yeast: Cloning, Sequencing and One-step Gene Disruption of the 3-Isopropylmalate Dehydrogenase Gene (LEU2) of *Candida boidinii* to Derive Doubly Auxotrophic Marker Strains," Journal of Bacteriology, 1992, Vol. 174(18), pages 5988-5993, entire document, especially fig. 2
- Document 9: Ying-Pei ZHANG et al., "LEU2 Gene Homolog in *Kluyveromyces lactis*," Yeast, 1992, Vol. 8, pages 801-804, entire document, especially fig. 1
- Document 10: JP 9-3097 A (The Green Cross Corp.), 07 January 1997, claims, SEQ ID NO: 5, fig. 5, (Family: none)
- Document 11: WO 00/14259 A1 (Kirin Brewery Co., Ltd.), 16 March 2000, claims, SEQ ID NO: 2-3, & JP 2000-78978 A
- Document 12: WO 92/17595 A1 (The Salk Institute Biotechnology/Industrial Associates), 15 October 1992, claims, SEQ ID NO: 1-2, & JP 6-506117 A & EP 578746 A1 & US 5324660 A

- Document 13: Anahit V. AZARYAN et al., "Purification and Characterization of a Paires Basic Residue-specific Yeast Aspartic Protease Encoded by the YAP3 Gene," The Journal of Biological Chemistry, 1993, Vol. 268(16), pages 11968-11975, entire document
- Document 14: Hiroto KOMANO et al., "Shared Functions in vivo of a Glycosyl-phosphatidylinositol-linked aspartyl protease, Mkc7, and the Proprotein Processing Protease Kex2 in Yeast," Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995, Vol. 92, pages 10752-10756, entire document, especially fig. 2
- Document 15: Ed T. BUURMAN et al., "Molecular Analysis of CaMnt1p, a Mannosyl Transferase Important for Adhesion and Virulence of *Candida albicans*," Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, Vol. 95, pages 7670-7675, entire document, especially fig. 1
- Document 16: EP 314096 A2 (Zymogenetics, Inc.), 03 May 1989, claims, fig. 4, & JP 2-419 A & US 5135854 A & DE 3887082 A
- Document 17: A. M. LEDEBOER et al., "Molecular Cloning and Characterization of a Gene Coding for Methanol Oxidase in *Hansenula polymorpha*," Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, Vol. 95, pages 7670-7675, entire document, especially fig. 6
- Document 18: EP 173378 A2 (Nnilever PLC), 05 March 1986, claims, fig. 11 and 13, & JP 61-92569 A & US 5240838 A & DE 3583194 A
- Document 19: WO 00/78978 A1 (Zymogenetics Inc.), 28 December 2000, claims, SEQ ID NO 1-2, & JP 2003-503030 A & EP 1192263 A1

Document 1 discloses a method for producing proteins that have a mammalian-type sugar chain by introducing vectors that express α -1,2-mannosidase into a methylotroph yeast, and specifically discloses features wherein vectors that express α -1,2-mannosidase are introduced into a *Pichia*-species yeast and the *Och1* genes are deactivated. Furthermore, document 1 indicates that AOXI, AOXII, GAP and the like can be selected as the promoter for said vectors, and that ER retention signals are added to the α -1,2-mannosidase genes.

Document 2 discloses a method for producing proteins that have a mammalian-type sugar chain, and specifically discloses the features of producing mutants of *Pichia pastoris* that do not express *OCH1* and of transforming the mutants so that they express mannosidase. Document 2 also indicates that the α -1,2-mannosidase is obtained from microscopic organisms such as *Aspergillus saitoi*.

Claims 1-3, 6-7, 10-14, 16 and 23-25 lack novelty in the light of the disclosures of document 1.

Claims 1-3, 10-12 and 23-25 lack novelty in the light of the disclosures of document 2.

In addition, it would be easy for a person skilled in the art to apply these features to *Ogataea minuta*, which is one type of methylotroph yeast, to express α -1,2-mannosidase using a promoter such as AOXI, AOXII or GAP, and to obtain a protein that has a desired N-type sugar chain by deactivating the gene related to the production of the sugar chain and introducing an appropriate heterogeneous gene.

Therefore, it is considered to have been easy for a person skilled in the art to conceive of the inventions that are set forth in claims 1-25 and 94-122 in the light of documents 1-4.

Documents 3-4 disclose the URA3 gene from *Candida boidinii* and the URA3 gene from *Pichia stipitis*.

Document 5 discloses the ADE1 gene from *Candida utilis*.

Documents 6-7 disclose the HIS3 gene from *Pichia pastoris* and the HIS3 gene from *Candida utilis*.

Documents 8-9 disclose the LEU2 gene from *Candida boidinii* and the LEU2 gene from *Kluyveromyces lactis*.

Document 10 discloses α -1,6-mannosidase from a *Pichia*-species yeast and the gene that codes said mannosidase, and indicates that this gene is homologous to the OCH1 gene.

Document 11 discloses proteases A and B from *Candida boidinii* and the genes that code said proteases.

Document 12 discloses protease A from a *Pichia*-species yeast and the gene that codes said protease.

Documents 13-14 disclose the protease YAP3 from yeast and the gene that codes said protease.

Document 15 discloses the KTR1 gene from *Saccharomyces cerevisiae*.

Document 16 discloses the MNN9 gene from *Saccharomyces cerevisiae*.

Documents 17-18 disclose the MOX gene from *Saccharomyces cerevisiae* and *Hansenula polymorpha*.

Document 19 discloses the GAP1 gene from *Pichia methanolica*, and the promoter and terminator therefor.

On the priority date for the present application, it was common practice in this technical field to synthesize a probe or primer from a portion of a known base sequence that codes a useful natural protein in order to clone the same DNA chain from a different natural source (refer to, for example, Pro. N.A.S., Vol. 72, 1975, pages 3961-3965); therefore, it is not considered to be especially difficult for a person skilled in the art to use probes that are synthesized from portions of the base sequences of each of the genes that are disclosed in

documents 3-19 in order to obtain the URA3 gene, ADE1 gene, HIS3 gene, LEU2 gene, OCH1 gene, PEP4 gene, PRB1 gene, YPS1 gene, KTR1 gene, MNN9 gene, AOX gene, GAPDH gene and the promoters and terminators of the AOX gene and GAPDH gene from *Ogataea minuta*.

In addition, it is common practice for a person skilled in the art to create recombined vectors that contain said genes, transform *Ogataea minuta* using said recombinant vectors, and produce proteins by cultivating the obtained transformants.

Therefore, it is considered to have been easy for a person skilled in the art to conceive of the inventions that are set forth in claims 26-93 in the light of documents 3-19.

特 許 協 力 条 約

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
〔PCT36条及びPCT規則70〕

REC'D 14 SEP 2004

WIPO PCT

出願人又は代理人 の書類記号 PH-1796-PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/ IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO3/05464	国際出願日 (日.月.年) 28.04.03	優先日 (日.月.年) 26.04.02
国際特許分類 (IPC) Int. Cl ⁷ C12N15/09, 1/19, 9/04, 9/10, 9/50//C12R1:645		
出願人 (氏名又は名称) 麒麟麦酒株式会社		

- 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条（PCT36条）の規定に従い送付する。
- この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 6 ページからなる。
☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で ページである。

- この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

- I ☒ 国際予備審査報告の基礎
- II ☐ 優先権
- III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV ☒ 発明の単一性の欠如
- V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI ☐ ある種の引用文献
- VII ☐ 国際出願の不備
- VIII ☐ 国際出願に対する意見

CORRECTED
VERSION

国際予備審査の請求書を受理した日 28.04.03	国際予備審査報告を作成した日 04.11.03	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 坂崎 恵美子	4N 9451
電話番号 03-3581-1101 内線 3488		

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 出願時に提出されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 _____ ページ/図、 出願時に提出されたもの
図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☒ この国際出願と共に提出された磁気ディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された磁気ディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☒ 書面による配列表に記載した配列と磁気ディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

IV. 発明の単一性の欠如

1. 請求の範囲の減縮又は追加手数料の納付の求めに対して、出願人は、

- ☐ 請求の範囲を減縮した。
- ☐ 追加手数料を納付した。
- ☐ 追加手数料の納付と共に異議を申立てた。
- ☐ 請求の範囲の減縮も、追加手数料の納付もしなかった。

2. ☒ 国際予備審査機関は、次の理由により発明の単一性の要件を満たしていないと判断したが、PCT規則68.1の規定に従い、請求の範囲の減縮及び追加手数料の納付を出願人に求めないこととした。

3. 国際予備審査機関は、PCT規則13.1、13.2及び13.3に規定する発明の単一性を次のように判断する。

- ☐ 満足する。
- ☒ 以下の理由により満足しない。

この国際出願は、以下の発明に分けられる。

- ①請求の範囲1-25, 94-122:哺乳類型糖鎖を製造し得るメチロトロフ酵母の作製方法に関する発明
- ②請求の範囲26-30:オロチジン-5'-リン酸脱炭酸酵素(URA3)遺伝子に関する発明
- ③請求の範囲31-35:ホスホリボシル-アミノ-イミダゾールスクシノカルボキサミド合成酵素(ADE1)遺伝子に関する発明
- ④請求の範囲36-40:イミダゾール-グリセロール-リン酸-デヒドラターゼ(HIS3)遺伝子に関する発明
- ⑤請求の範囲41-45:3-インプロピルリンゴ酸脱水素酵素(LEU2)遺伝子に関する発明
- ⑥請求の範囲46-49:α-1,6-マンノシルトランスフェラーゼ(OCH1)遺伝子に関する発明
- ⑦請求の範囲50-53:PEP4遺伝子に関する発明
- ⑧請求の範囲54-57:プロテイナーゼB(PRB1)遺伝子に関する発明
- ⑨請求の範囲58-69:YPS1遺伝子に関する発明
- ⑩請求の範囲70-73:KTR1遺伝子に関する発明
- ⑪請求の範囲74-77:MNN9遺伝子に関する発明
- ⑫請求の範囲78-85:アルコールオキシダーゼ(AOX)遺伝子に関する発明
- ⑬請求の範囲86-93:グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素(GAPDH)遺伝子に関する発明

しかし、①の哺乳類型糖鎖を製造し得るメチロトロフ酵母の作製方法、②のオロチジン-5'-リン酸脱炭酸酵素(URA3)遺伝子に関する発明、③のホスホリボシル-アミノ-イミダゾールスクシノカルボキサミド合成酵素(ADE1)遺伝子に関する発明、④のイミダゾール-グリセロール-リン酸-デヒドラターゼ(HIS3)遺伝子に関する発明、⑤の3-インプロピルリンゴ酸脱水素酵素(LEU2)遺伝子に関する発明、⑥のα-1,6-マンノシルトランスフェラーゼ(OCH1)遺伝子に関する発明、⑦のPEP4遺伝子に関する発明、⑧のプロテイナーゼB(PRB1)遺伝子に関する発明、⑨のYPS1遺伝子に関する発明、⑩のKTR1遺伝子に関する発明、⑪のMNN9遺伝子に関する発明、⑫のアルコールオキシダーゼ(AOX)遺伝子に関する発明及び⑬のグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素(GAPDH)遺伝子に関する発明は、本願優先権主張日前公知であるから(国際調査報告「C. 関連すると認められる文献」参照)、先行技術に対する特別の技術的特徴であるとは認められない。

従って、これらの13つの発明群が単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であると認められない。

4. したがって、この国際予備審査報告書を作成するに際して、国際出願の次の部分を、国際予備審査の対象にした。

- ☒ すべての部分
- ☐ 請求の範囲 _____ に関する部分

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲	4-5, 8-9, 15, 17-22, 26-122	有
	請求の範囲	1-3, 6-7, 10-14, 16, 23-25	無
進歩性 (IS)	請求の範囲		有
	請求の範囲	1-122	無
産業上の利用可能性 (IA)	請求の範囲	1-122	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

- 文献1: WO 02/00856 A2, (Flanders Interuniversity Institute for Biotechnology) 2002.01.03,
特許請求の範囲及び実施例等参照,
& US 2002/188109 A & EP 1294910 A2
- 文献2: WO 02/00879 A2, (Glycofi INC.) 2002.01.03,
特許請求の範囲, Table3及び実施例等参照,
& US 2002/137134 A & EP 1297172 A2
- 文献3: Yasuyoshi Sakai et al. "The Orotidine-5'-Phosphate Decarboxylase Gene (*URA3*) of a Methylophilic Yeast, *Candida boidinii*: Nucleotide Sequence and Its Expression in *Escherichia coli*"
Journal of Fermentation and Bioengineering, 1992, Vol.73(4), p.255-260,
文献全体, 特にFig2参照
- 文献4: Vina W. Yang et al. "High-Efficiency Transformation of *Pichia stipitis* Based on Its *URA3* Gene and a Homologous Autonomous Replication Sequence, ARS2"
Applied and Environmental Microbiology, 1994,
Vol.60(12), p.4245-4254,
文献全体, 特にFig3参照
- 文献5: Yoshiaki Nishiya et al. "Primary Structure of *ADE1* Gene from *Candida utilis*"
Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 1994,
Vol.58(1), p.208-210,
文献全体, 特にFig3参照
- 文献6: Inmaculada C. Cosano et al. "Cloning and Sequence Analysis of the *Pichia pastoris* *TRP1*, *IPPI* and *HIS3* Genes"
Yeast, 1998, Vol.14, p.861-867,
文献全体, 特にFig4参照
- 文献7: WO 98/14600 A1, (CENTRO DE INGENIERIA Y BIOTECNOLOGIA) 1998.04.09,
特許請求の範囲及び配列番号5-6等参照,
& JP 2001-501475 A & EP 956356 A1

補充欄 (いずれかの欄の大きさが足りない場合に使用すること)

第 V 欄の続き

- 文献8 : Yasuyoshi Sakai et al. "Directed Mutagenesis in an Asporogenous Methylophilic Yeast: Cloning, Sequencing, and One-Step Gene Disruption of the 3-Isopropylmalate Dehydrogenase Gene (LEU2) of *Candida boidinii* To Derive Doubly Auxotrophic Marker Strains" *Journal of Bacteriology*, 1992, Vol.174(18), p. 5988-5993,
文献全体, 特にFig1-2参照
- 文献9 : Ying-Pei Zhang et al. "LEU2 Gene Homolog in *Kluyveromyces lactis*" *Yeast*, 1992, Vol.8, p. 801-804,
文献全体, 特にFig1参照
- 文献10 : JP 9-3097 A, (株式会社ミドリ十字) 1997.01.07,
特許請求の範囲, 配列番号5及び図5等参照,
(ファミリーなし)
- 文献11 : WO 00/14259 A1, (麒麟麦酒株式会社) 2000.03.16,
特許請求の範囲及び配列番号2-3等参照,
& JP 2000-78978 A
- 文献12 : WO 92/17595 A1, (The Salk Institute Biotechnology/Industrial Associates) 1992.10.15,
特許請求の範囲及び配列番号1-2等参照,
& JP 6-506117 A & EP 578746 A1 & US 5324660 A
- 文献13 : Anahit V. Azaryan et al. "Purification and Characterization of a Paires Basic Residue-specific Yeast Aspartic Protease Encoded by the YAP3 Gene" *The Journal of Biological Chemistry*, 1993, Vol.268(16), p. 11968-11975,
文献全体参照
- 文献14 : Hiroto Komano et al. "Shared functions *in vivo* of a glycosyl-phosphatidylinositol-linked aspartyl protease, Mkc7, and the proprotein processing protease Kex2 in yeast" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, Vol.92, p. 10752-10756,
文献全体, 特にFig2等参照
- 文献15 : Ed T. Buurman et al. "Molecular analysis of CaMntlp, a mannosyl transferase important for adhesion and virulence of *Candida albicans*" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, Vol.95, p. 7670-7675,
文献全体, 特にFig1等参照
- 文献16 : EP 314096 A2, (Zymogenetics, INC.) 1989.05.03,
特許請求の範囲及びFig4等参照,
& JP 2-419 A & US 5135854 A & DE 3887082 A
- 文献17 : A M. Ledebøer et al. "Molecular cloning and characterization of a gene coding for methanol oxidase in *Hansenula polymorpha*" *Nucleic Acids Res.* 1985, Vol.13(9), p. 3063-3082,
文献全体, 特にFig6等参照
- 文献18 : EP 173378 A2, (Nnilever PLC) 1986.03.05,
特許請求の範囲及びFig11, 13等参照,
& JP 61-92569 A & US 5240838 A & DE 3583194 A
- 文献19 : WO 00/78978 A1, (Zymogenetics INC.) 2000.12.28,
特許請求の範囲及び配列番号1-2等参照,
& JP 2003-503030 A & EP 1192263 A1

補充欄 (いずれかの欄の大きさが足りない場合に使用すること)

第 V 欄の続き

文献1には、 α -1,2-マンノシダーゼを発現するベクターをメチロトロフ酵母に導入して、哺乳類型糖鎖を有するタンパク質を製造する方法が記載されており、具体的には、*Pichia*属酵母に α -1,2-マンノシダーゼを発現するベクターを導入するとともに*Och1*遺伝子を不活性化する旨記載されている。さらに、該ベクターのプロモーターとして*AOXI*、*AOXII*、*GAP*などが選択される旨及び α -1,2-マンノシダーゼ遺伝子にER滞留シグナルを付加する旨の記載もされている。

文献2には、哺乳類型糖鎖を有するタンパク質を製造する方法が記載されており、具体的には*Pichia pastoris*の*OCH1*を発現しない変異体を製造し、マンノシダーゼを発現するように形質転換する旨の記載がされている。 α -1,2-マンノシダーゼが*Aspergillus saitoi*等の微生物由来である旨示されている。

文献1に記載されているように、請求の範囲1-3, 6-7, 10-14, 16, 23-25は新規性を有しない。

文献2に記載されているように、請求の範囲1-3, 10-12, 23-25は新規性を有しない。

また、メチロトロフ酵母の1種である*Ogataea minuta*を適用すること、*AOXI*、*AOXII*、*GAP*等のプロモーターを用いて α -1,2-マンノシダーゼを発現させること、所望のN型糖鎖を有する蛋白質を得るために、適切な異種遺伝子を導入すること及び糖鎖の製造に関与する遺伝子を不活性化することは、当業者であれば容易に行うことである。

したがって、請求の範囲1-25, 94-122は、文献1-4に基づいて、当業者が容易に想到したものと認められる。

文献3-4には、*Candida boidinii*由来の*URA3*遺伝子及び*Pichia stipitis*由来の*URA3*遺伝子が記載されている。

文献5には、*Candida utilis*由来の*ADE1*遺伝子が記載されている。

文献6-7には、*Pichia pastoris*由来の*HIS3*遺伝子及び*Candida utilis*由来の*HIS3*遺伝子が記載されている。

文献8-9には、*Candida boidinii*由来の*LEU2*遺伝子及び*Kluyveromyces lactis*由来の*LEU2*遺伝子が記載されている。

文献10には、*Pichia*属に属する酵母由来の α -1,6-マンノシダーゼ及び該マンノシダーゼをコードする遺伝子が記載されており、*OCH1*遺伝子と相同性を有する旨の記載がされている。

文献11には、*Candida boidinii*由来のプロテアーゼA、B及び該プロテアーゼをコードする遺伝子が記載されている。

文献12には、*Pichia*属に属する酵母由来のプロテアーゼA及び該プロテアーゼをコードする遺伝子が記載されている。

文献13-14には、酵母由来のプロテアーゼ*YAP3*及び該プロテアーゼをコードする遺伝子が記載されている。

文献15には、*Saccharomyces cerevisiae*由来の*KTR1*遺伝子が記載されている。

文献16には、*Saccharomyces cerevisiae*由来の*MNN9*遺伝子が記載されている。

文献17-18には、*Saccharomyces cerevisiae*及びハンセンヌラ・ポリモーファ由来の*MOX*遺伝子が記載されている。

文献19には、*Pichia methanolica*由来の*GAP1*遺伝子、プロモーター及びターミネーターが記載されている。

天然の有用な蛋白質をコードした塩基配列が1つ知られている場合、その配列の一部からプローブやプライマーを合成して天然から別の種由来の同一DNA鎖をクローニングする技術は、本願優先権主張日当時、当該技術分野における技術常識であるから（例えば、Pro. N. A. S., Vol. 72 (1975) p. 3961-3965等参照）、文献3-19に記載されている各遺伝子の塩基配列の一部から合成したプローブを用いて、*Ogataea minuta*由来の*URA3*遺伝子、*ADE1*遺伝子、*HIS3*遺伝子、*LEU2*遺伝子、*OCH1*遺伝子、*PEP4*遺伝子、*PRB1*遺伝子、*YPS1*遺伝子、*KTR1*遺伝子、*MNN9*遺伝子、*AOX*遺伝子及び*GAPDH*遺伝子、*AOX*遺伝子及び*GAPDH*遺伝子のプロモーターとターミネーターを得ることは、当業者にとって格別の困難性があるとは認められない。また、該遺伝子を含有する組換えベクター、該組換えベクターで*Ogataea minuta*を形質転換すること、得られた形質転換体を培養してタンパク質を製造することは、当業者が通常行う範囲のことである。

したがって、請求の範囲26-93は、文献3-19に基づいて、当業者が容易に想到したものと認められる。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.